

## ② 公開特許公報 (A) 平4-197182

③ Int. CL. 5

C 12 N 15/57  
 C 11 D 3/388  
 C 12 N 9/54  
 //C 12 N 15/57  
 C 12 R 1:07)  
 (C 12 N 9/54  
 C 12 R 1:07)

識別記号

ZNA

庁内整理番号

7614-4H  
7823-4B

④ 公開 平成4年(1992)7月16日

8717-4B C 12 N 15/00

A  
審査請求 未請求 請求項の数 9 (全17頁)

⑤ 発明の名称 アルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>の製造方法

⑥ 特願 平2-327110

⑦ 出願 平2(1990)11月28日

⑧ 発明者 戸部聖一 神奈川県中郡二宮町山西457  
 ⑨ 発明者 大寺基靖 神奈川県平塚市日向岡2-2-34  
 ⑩ 発明者 滝井芳男 神奈川県中郡二宮町百合が丘2-23-3  
 ⑪ 出願人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号  
 ⑫ 代理人 弁理士 中村稔 外8名

## 明細書

1. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) アルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>酵素をコードするDNA。  
 (2) 下記のアミノ酸配列で特定される請求項1記載のDNA。

1 20  
 AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyr  
 21 40  
 GlyGlnGlyGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArgAsnAspSer  
 41 60  
 SerMetHisGluAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAlaLeuGlyArgThrAsn  
 61 80  
 AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlySerValLeuGlyAsnAla  
 81 100  
 LeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValIpheGlnSerIleMetAspSerSer  
 101 120  
 GlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAlaTrpAsnAla  
 121 140  
 GlyAlaArgIleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyrThrAlaAsn

141 160  
 SerArgGlnValAspGluTyrValArgAsnAsnAspMetThrValLeuPheAlaAlaGly  
 161 180  
 AsnGluGlyProAsnSerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlaIleThr  
 181 200  
 ValGlyAlaThrGluAsnTyrArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnHis  
 201 220  
 IleAlaGlnPheSerSerArgGlyAlaThrArgAspGlyArgIleLysProAspValIleThr  
 221 240  
 AlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSerSerLeuAlaProAspSerSerPheTrp  
 241 260  
 AlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaIleTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThrProIleVal  
 261 280  
 AlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluAlaPheIleLysAsnArgGlyIleThrProLys  
 281 300  
 ProSerLeuIleLysAlaAlaLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeuGlyTyrPro  
 301 320  
 SerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyrVal  
 321 340  
 AsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAla  
 341 360  
 GlyLysProLeuLysIleSerLeuValIleTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSer  
 361 380  
 TyrThrLeuValAsnAspLeuAspLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrVal  
 381 400  
 GlyAsnAspPheSerTyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAsn

401 ValPhelleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnVal  
431 433  
ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlaIleValHis

(3) 下記のDNA配列で特定される請求項1記載のDNA。

1 60  
AATGATCTAGCAAGAGGGATACTAAAGCTGATGTTGACAAAACAATTACGGATTATAT  
61 120  
CCACAAAGCTCAACTACTTCCAGTACCGGACACACGGCTTACATAACGGTCTAACCTAGT  
121 180  
TCTATGATGAAGCATTCCCCGGAAAAATCACAGCTCTTACGGCTTAGGAAGAACTAAT  
181 240  
AATGCGACTGATCCGAATGGGCATGCCACACATGTAACCAAGGTTCTGACTTGGTAATGCT  
241 300  
TTAAATAAAGGAATGGCTCCCAAGCTAACTTAGTCTTCAATCTATTATGGATACCCG  
301 360  
GGAGGATTACGTGGCTTACCATCGAACTTAAATACGTTATTTAGTCAACGTTGGAAATGCT  
361 420  
GGAGCAAGAATTCAACTACTTGGGGACCCCCAGTAAATGGAGGCTACACTGCTAAC  
421 480  
TCGAGACAAGTGGATGAGTATGTTGAAATAATGATGACGGTACTTTTGGAGCTGCT  
481 540  
AATGAAGGTCTAATTCAAGGAACAATTAGTGGCTCAGGTACAGGGAAAAATGCTATTACG

541 600  
GTCGGGGCAACGGAAAATATCGCCCAAGCTTCGGTTGATAGCAGATAACCCAAATCAT  
601 660  
ATTGCACAATTTCATCGACAGGAGCTACCGGGATCCACGAATTAGCCTGACGTAACA  
661 720  
GCTCTGGAACATTATTTATCACACGTTCTTCCTTAAGCTCCAGACTTTCGTTTG  
721 780  
GGCAATTATAACGTAATACGGTATATGGGGTACCTCATGGGACACCTATTGTT  
781 840  
CCACGGAAATGTCGCGCAATTACCTGACCTTTATAAAAAATAGAGCTATTACTCTAAC  
841 900  
CCTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATCGCTGGCTACTGATGTTGGTTAGGATATCCT  
901 960  
ACTCGTGAACCAAGGCTGGGGCGTGTACTCTAGATAATCGTTAAATGACCGTATGTC  
961 1020  
AATGAAGCAACTCCATTAGCCACAGCACAAAACACCTATTGTTCAAGCACACGG  
1021 1080  
GGTAAACCTTTAAATCTGTTAGTATGGACACATGCTCTGGAAAGTACAACCTGAT  
1081 1140  
TATACACTAGTTAATGTTAGATCTAGTTATTACTGCTCCGAATGGACAAAATATGTA  
1141 1200  
GGAATGATTTTACTTATGATAATAACTGGATGCTGGCAACAAATGTTGAGAAC  
1201 1260  
CTATTTATAACGCTCCGAATCTGCAACGTATATAATTGAGCTCAACCGTATAATGTA  
1261 1299  
CCATCTCCCCACACGGTTCTCACTAGCTATCGTACAT

(4) 請求項1又は2のDNAの上流に、中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域又はアミラーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域を有する請求項1記載のDNA。

(5) 請求項1～4のいずれか1項に記載のアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>酵素をコードするDNAを含有するプラスミドDNA。

(6) 請求項5記載のプラスミドDNAを導入した微生物。

(7) 微生物がバチルス属細菌である請求項6記載の微生物。

(8) 請求項6又は7記載の微生物を培養することにより培養物からアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>を採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>の製造方法。

(9) 微生物がバチルス属細菌であり、中性で培養する請求項8記載の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 【産業上の利用分野】

本発明は耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れ、洗浄力の改善に寄与しうるY<sub>a</sub>酵素（特開昭61-280278号）の遺伝子をコードするDNA断片及び該断片を含むプラスミドを導入した微生物を用いてY<sub>a</sub>酵素を製造する方法に関する。

#### 【従来の技術】

耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れたY<sub>a</sub>酵素は、通常のアルカリプロテアーゼが失活するような高pH液体洗浄剤に配合した場合でも、蛋白質分解活性を保持し、洗浄力の向上に寄与する能力を有している。Y<sub>a</sub>酵素は、バチルス・エスピーア<sub>a</sub>（Bacillus sp. Y）（微研菌寄第8088号）を培養することにより、その培養物中に見いだすことができるが、通常の培養を行なってもその生産量は低くこの状態では工業的レベルでの計算は困難と言わざるをえない。

一般に、バチルス属が生産するアルカリプロテアーゼの生産性を向上させるためには、化学物質、

紫外線照射等による変異処理等を用いた菌株の育種や培養条件の改良等を行ない、生産性を向上させることができることが試みられている。ところが菌株または製造物の種類によってその効果の程度は様々であり、偶然性によるところが大きい。そこで合理的かつ理論的に生産性の高まる製造方法、すなわち遺伝子組換え技術を用いたY<sub>a</sub>酵素の製造方法が望まれている。

また好アルカリ性細菌であるバチルス・エスピ－Y株は、アルカリ性の培地で培養を行なうために、栄養源の変質や培養液の着色等の様々な不都合が生じる。そのため中性付近での培養が可能になれば、培養工程や精製工程の簡略化が可能となり工業生産において有利である。

#### 〔発明が解決しようとする課題〕

Y<sub>a</sub>酵素の生産性を高めるためには、バチルス・エスピ－Y株を用いた従来の変異処理法を主体とした育種法では不十分な点がある。そこで本発明は、遺伝子組換え技術を用いることによりY<sub>a</sub>酵素の生産性の向上に利用できるY<sub>a</sub>酵素をコードする遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いてY<sub>a</sub>酵素の生産性を向上させうる方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、Y<sub>a</sub>酵素生産菌よりY<sub>a</sub>酵素遺伝子を単離し、その塩基配列を決定することにより、又Y<sub>a</sub>酵素遺伝子即ちY<sub>a</sub>酵素のプロモーターからシグナルペプチド、前駆体領域、成熟酵素領域及びターミネーターまでをコードする領域を含むDNA断片を適当な宿主菌に導入することによりY<sub>a</sub>酵素を生産し、さらにはプロモーター領域（以下、プロモーター領域とは一般的に大腸菌等で定義されるコンセンサス配列に加えて構造遺伝子の直前にあるShine-Dalgarno配列を含む転写及び翻訳に関与する5'未端非翻訳領域とする。）を、その宿主菌において効率よく作動するような他の遺伝子由来のプロモーター領域に置換することによりY<sub>a</sub>酵素を高生産化できることを見出し、該知見に基づいて完成された。

本発明に係るY<sub>a</sub>酵素遺伝子は、第1図に示す

塩基配列とアミノ酸配列を有する。この配列中には、転写、翻訳開始に関する領域、前駆体領域と成熟蛋白領域とが含まれ、このうち、203残基目～635残基目のアミノ酸配列が成熟タンパク質に相当し、本発明において重要である。つまり、本発明によれば上記203～635（成熟酵素領域）残基の上流に位置するプロモーター領域、分泌のための領域等を公知の手段により他の蛋白質をコードする遺伝子のそれらと置換し、より効率的にY<sub>a</sub>酵素を製造することができる。この際、本発明では、203～635残基の上流に位置するプロモーター領域をバチルス属細菌で強力に機能するようなプロモーター領域をもった遺伝子、例えばバチルス属細菌由来の中性又はアルカリプロテアーゼ又はアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域で置換したDNAをプラスミドに導入し、これをバチルス属細菌に導入することによって、中性領域（pH 6～8近辺）で培養することによりY<sub>a</sub>酵素を効率的に製造することができる。

第1図に示す塩基配列は、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子のク

ローニングにより決定できた。ここで用いるクローニング法としては、Y<sub>a</sub>酵素をコードする遺伝子をクローニングできる方法であればいかなる方法でも構わないが、例えば下記に示すような大腸菌を宿主菌として、バチルス・エスピ－Y株染色体のDNA断片を保持する組換え体を作製し、Y<sub>a</sub>酵素をコードする遺伝子と相補的なDNAを利用したハイブリダイゼーション法によってY<sub>a</sub>酵素遺伝子をクローニングすることができる。

Y<sub>a</sub>酵素生産菌、例えばバチルス・エスピ－Y株からY<sub>a</sub>酵素を精製し、必要に応じてトリプシン消化等により得られたY<sub>a</sub>酵素断片等を用いてアミノ酸配列を決定し、このうち好適なアミノ酸配列に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドをDNAプローブとして合成することができる。

次に、Y<sub>a</sub>酵素生産菌より染色体DNAを抽出する。用いる菌株としてはY<sub>a</sub>酵素を生産する菌株であればいかなる菌株でも構わないが、例えばバチルス・エスピ－Y株があげられる。染色体DNAを抽出する方法としてはサイトウミウラ

の方法 (Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)) 等によって翻製することができる。

このように取得した染色体DNAをEcoR I、Xba Iなどの制限酵素を用いて断片化し、アガロースゲル電気泳動に供し、合成したDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション (Molecular Cloning, 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.31 (1989)) を行ない、DNAプローブの組補性及びその組補するDNA断片の大きさを特定する。染色体DNAを消化する制限酵素は、他の制限酵素であっても構わない。DNAプローブは $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATPを用いることによって標識することができる。

次に特定したDNA断片を回収する。回収方法はどのような方法でも構わないが、例えばDEAEベーパー法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.24 (1989)) を用いてそのDNA断片を回収することができる。

DNAを抽出し、前記と同様にサザンハイブリダイゼーションを行ない、DNAプローブと組補する組換えプラスミドを保持する菌株を選択することによりY<sub>a</sub>酵素遺伝子を保持する形質転換株を取得することができる。

取得したY<sub>a</sub>酵素遺伝子の塩基配列はSangerらの方法等 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463 (1977)) により決定することができる。さらにその塩基配列によってY<sub>a</sub>酵素のアミノ酸配列を解明することができる。

本発明のDNA配列は天然のDNA配列のみに限定されるのではなく、本発明により明らかにされたY<sub>a</sub>酵素のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列も含まれる。また、本酵素の特徴である耐界面活性剤性及び耐アルカリ性等のY<sub>a</sub>酵素の機能を損なわない限りにおいて本発明のDNA配列及びアミノ酸配列に人為的な挿入、欠失、置換等を行なうことにより改造することは可能であり、本発明にはそのような変異遺伝子及び改質酵素蛋白質も含まれる。

さらに回収したDNA断片とベクターDNAとを連結する。そのDNA断片を消化した制限酵素と同じ制限酵素認識部位を持つベクターDNA、例えばpBR328、pUC118などを同一の制限酵素で消化する。さらにアルカリフェヌルターゼで脱糖酸したのち同一の制限酵素認識部位を有するDNA断片とT4リガーゼにより連結することができる。この反応物をHanahanの方法 (DNA Cloning Vol. 1 IRL Press, p. 109 (1985))に準じて大腸菌に導入することができる。

形質転換を行なった菌株の中からY<sub>a</sub>酵素遺伝子を保持する菌株を選択する。選択方法にはコロニーハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.90 (1989)) 等、様々な方法を用いることができるが、例えば形質転換を行なった各菌株よりアルカリ-SDS法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25 (1989)) を用いて

Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を発現させるために、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を適当な宿主菌に導入する。宿主菌としては、大腸菌、バチルス属、ショウドモナス (Pseudomonas)属等の細菌、アスペルギルス (Aspergillus)属、サッカロマイセス (Saccharomyces)属、キャンジダ (Candida)属等の微生物があげられるが他の宿主菌でも構わない。例えばバチルス属を宿主菌とした場合、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を分断することなく消化する制限酵素と同じ制限酵素でベクタープラスミド、例えばpUB110、pBD64等を消化し、これとY<sub>a</sub>酵素遺伝子をT4リガーゼを用いて連結させる。この反応物をプロトプラスト法 (S. Chang, Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)) を用いてバチルス属細胞に導入することができる。Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を含むDNAを導入した宿主菌を培養し、その培養物よりY<sub>a</sub>酵素を取得する。Y<sub>a</sub>酵素の発現の確認及びその発現量はウエスタン・ブロッティング、蛋白質分解力の測定等により行なうことができる。

Y<sub>a</sub> 酵素の生産性を増大させるためには、プロモーター領域を宿主菌にとって効率のよいプロモーター領域と交換して発現させることにより、生産性を増大させることができる。例えばバチルス属細菌由来の中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター領域、アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域等が好都合である。例えばY<sub>a</sub> 酵素遺伝子由来のプロモーター領域をバチルス・ライヘンホルミス(Bacillus licheniformis)由来のアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換する。そして、例えばプロモーター領域後方部分に部位特異的変異法を用いて制限酵素認識部位、例えばBclI 認識部位等を作製し、制限酵素を用いたプロモーター領域の切除及びT4リガーゼを用いた連結等を行なうことによりプロモーター領域の交換を行なうことができる。さらにプロモーター領域の交換を行なったY<sub>a</sub> 酵素遺伝子をバチルス・サチルス(Bacillus Subtilis)に導入し、培養を行なうことによりY<sub>a</sub> 酵素を生産させる。これにより

もとのY<sub>a</sub> 酵素遺伝子由来のプロモーター領域を用いた場合に比べて生産性を増大させることができる。

上記に示す手法によりプロモーター領域を交換したY<sub>a</sub> 酵素遺伝子を含むプラスミドを保持するバチルス・サチルスを用いてY<sub>a</sub> 酵素の極めて高い生産性を獲得することができる。

上記バチルス・サチルスは、上記バチルス・サチルスが生育できる培地であればいずれでもかまわないが、例えば炭素源としてグルコース、澱粉、糖蜜等、窒素源としてはペプトン、ポリペプトンS、大豆粉、コーンスティーブリカ等、さらにミネラル等を含む培地を用いて温度30-40℃、50-100時間培養することができる。また培養物から陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等により、Y<sub>a</sub> 酵素を精製できる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 〔実施例〕

##### 実施例 1

###### サザンハイブリダイゼーション

Y<sub>a</sub> 酵素のN末端領域のアミノ酸配列をアブライド・バイオ・システムズ社(AB I社)製プロテインシーカンサー377Aを用いて決定した。結果は以下に示す通りであった。

N'-AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAla  
GlnAsnAsnTyrGly

Y<sub>a</sub> 酵素の中央部ないしC末端領域のアミノ酸配列を解析するため、トリプシン消化により得られた試料を用いて同様の操作を行なった。その結果を以下に示す。

N'-LysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThr

これらの解析結果よりイノシン法に基いて以下に示すオリゴスクレオチドDNAをAB I社製DNA合成装置381Aを用いて作製した。

A A T  
プローブN: 5' CCATA TT TT TGIGGIACTCIGC 3'  
G G C

A T  
プローブC: 5' GTICCIICCCATATAIGC TA TT 3'  
G C

上記プローブについては、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-dATP(アマシャム社製)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を用いて5'末端を<sup>32</sup>Pで標識した。

バチルス・エスピード株をNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.0g/1を含むアイヨン培地(極東製薬社製)200mlを含む坂口フ拉斯コに種蒔し、30℃で終夜培養した。菌体約2gを取得し、サイトウーミウラの方法に準じて染色体DNAを2.8ng調製した。このDNA 1.0 $\mu$ gをEcoRI(制限酵素はすべて宝酒造製)またはXbaIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、先に調製したプローブNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、EcoRIで消化した染色体DNA断片では、約2.8KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2KbpのDNA断片がハイブリダイズした。さらに同操作をプローブCにつ

いても行なったところ、EcoRIで消化した染色体DNA断片では約2.0KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2KbpのDNA断片がハイブリダイズした。

#### クローエング

前述の染色体DNA200μgをEcoRIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8KbpのDNA断片をDEAEペーパー法を用いて2.0μg回収した。また約2.0KbpのDNA断片についても同様の操作を行ない2.0μg回収した。染色体DNA200μgをXbaIで消化し同様の操作を行ない約1.2KbpのDNA断片を1.0μg回収した。pBR328(ベーリンガー社製)1μgをEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼ(ベーリンガー社製)で脱糖酸後、フェノール抽出、すなわちフェノール-クロロホルム混液(1:1)を加え蛋白質変性を行ない、遠心分離後上清を回収する操作を行なった。さらにエタノール沈殿、すなわち0.1倍量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)及び2倍量のエタノールを加え-80

℃10分冷却後遠心分離によりDNAを回収する操作を行なった。このうち0.2μgと前述の約2.8KbpのEcoRI断片0.05μgをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結した。この反応物をハナハムの方法に準じて大腸菌HB101株に導入した。生育した形質転換体500株よりアルカリ-SDS法を用いてDNAを抽出し、前記のプローブNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果プローブNとハイブリダイズするプラスミドpYTI01(第2図)を見いだし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。さらに約2KbpのEcoRI断片についても前述のプローブCを用いて同様の操作を行ない、プローブCとハイブリダイズするプラスミドpYB2(第3図)を見いだし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。また、pUC118(宝酒造社製)1μgをXbaIで消化しアルカリフォスファターゼで脱糖酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なった。このうち0.2μgと前述の約1.2KbpのXbaI断片0.05μgを

ライゲーションキットを用いて連結し、同様の操作をプローブNを用いて行なった。その結果プローブNとハイブリダイズするプラスミドpYX1(第4図)を見いだし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。

#### 塩基配列の決定

取得したプラスミドpYTI01、pYB2及びpYX1のY<sub>a</sub>酵素遺伝子の一部をpUC118及びpUC119(宝酒造社製)にサブクローニングし、宝酒造社製のマニュアルに従って1本鎖DNAを調製した。この1本鎖DNAとα-<sup>32</sup>S-dCTP(タマシヤム社製>37TBq/mmol)及びSEQUENASE(東洋紡社製)を用いて塩基配列の決定を行なった。この結果得られた塩基配列を第1図に示す。218bpから2122bpに存在するオープン・リーディングフレームより解明されたアミノ酸配列には、前述のY<sub>a</sub>酵素のプロネンシーケンサーによるアミノ酸配列の解析により確認されたアミノ酸配列と一致する配列が203残基目からと448残基目からに見いだせる。ま

たN末端が203残基目から始まることから、翻訳開始から202残基目までが前駆体領域であり、203残基目以降が成熟酵素を構成する領域と判断される。

#### 実施例 2

##### プロモーターの取得

バチルス・ライヘンホルミスLB8907株をブイヨン培地200mlを含む坂口フラスコに植菌し、30℃で絶対培養を行ない、菌体約1gを取得し、サイトウーミウラの方法に準じて染色体DNAを2.0mg調製した。このうち50μgをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった。pUC118-1μgをEcoRIで消化後アルカリフォスファターゼを用いて脱糖酸し、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない、このうち0.2μgと染色体DNAのEcoRI断片0.05μgをライゲーションキットを用いて連結し、この反応物をハナハムの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体を1%サツマイモデンブン(純正化学社製)を含む

L培地（バクトトリプトン1.0 g／1、バクトイーストエキス5 g／1、NaCl 0.5 g／1、バクトアガー2.0 g／1、アンビシリン 1.0 mg／1、pH7.2）に継菌し37℃で約4.0時間培養した。その結果形質転換体2000株より、デンプンを分解する、即ちアミラーゼ遺伝子を有する菌株を1株取得した。この菌株が保持するプラスミドpTA1（第5図）のプロモーター領域の塩基配列を実施例1に準じて決定し、その結果を第6図に示す。

#### Y<sub>a</sub>酵素を発現しうるプラスミドの作製

プラスミドpYB2 5.0 μgをEcoRI及びSphIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05 μgと、あらかじめEcoRI、SphIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収したpUC118 0.2 μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生

育した形質転換体の中から第7図に示すpUC118ESを保持する菌株を取得した。pYT101 5.0 μgをEcoRIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2.7 KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05 μgと、あらかじめEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収したpUC118ES 0.2 μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入し、生育した形質転換体の中から第7図に示すpTB3を保持する菌株を取得した。

ABI社製DNA合成装置381A型を用いて下記に示すDNAプローブ（第1図の1181-1210bpに対応）を合成し、

5'-CCAAGAGTTAGTATCGATTCTTCCTCCAGC-3'  
宝酒造社製部位特異的変異法キットMutan-Kを用いて、pTB3のY<sub>a</sub>酵素のアミノ酸配列を変えずに塩基配列を変更し、EcoRI部位を消失させたプラスミドpTB3Eを取得した。さらに下記

に示すDNAプローブ（第1図の200-229bpに対応）を合成し、

5'-TTTCCCCCTTCATTGATCATCAACTCTCTCAT-3'

同様にして塩基配列を変更し、Y<sub>a</sub>酵素翻訳開始コドン上流にBclI認識部位を作製したプラスミドpTB3EBを取得した。

また下記に示すDNAプローブを合成し、（第6図の216-245bpに対応）を合成し、

5'-TGTGTTTCATGATCATCCTCCCCCTTCAA-3'

同様にしてpTA1の塩基配列を変更し、プロモーター領域下流にBclI認識部位を持つプラスミドpTA1Bを作製した。

pUC118 1 μgをEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収した。このうち0.2 μgとあらかじめEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行い回収したpUB110 0.05 μgをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形

質転換体の中から第8図に示すプラスミドpUB81を保持する菌株を取得した。pTB3E 5 μgをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった後、クレノウフラグメント（宝酒造社製）を用いてDNA末端を平滑化した。さらにフェノール抽出、エタノール沈殿を行い、このうち0.2 μgとSphIリンク（ニューアイギングランドバイオラブ社製）5.0 ngをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法を用いて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体のうちSphI認識部位が新たに作製されたプラスミドpTB3ES（第8図）を保持する菌株を取得した。pTB3ES 5.0 μgをSphIで消化し、DEAEペーパー法を用いて4.6 KbpのDNA断片を回収した。このDNA断片0.05 μgと、SphIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なったpUB81 0.2 μgとをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をプロトプラス法を用いてバチルス・サチルス1012株に導入した。生育し

た形質転換体のうち第8図に示すプラスミドpUB8Yを保持する菌株を取得した。

pTA1B 5.0 μgをEcoRI及びBclIで消化し、DEAEペーパー法を用いて約1KbpのDNA断片を回収した。pTB3EB1 1μgをEcoRI及びBclIで消化しアルカリフォスファターゼで脱糖酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ない回収した。このうち0.2 μgと前記のpTA1B由来の1Kbp DNA断片0.05 μgとをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミドpAY1を保持する菌株を取得した。

pAY1 5.0 μgをSphI、さらにベクター側のフラグメントを分断するためXbaIで消化し、DEAEペーパー法を用いて約3.5KbのDNA断片を回収した。pUB81 1 μgをSphIで消化しアルカリフォスファターゼで脱糖酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ない回収した。

を遊離させる酵素量を1アルカリプロテアーゼ単位(APU)とした。各培養上清のアルカリプロテアーゼ活性の結果を表-1に示す。pUB8Yを保持する形質転換体のアルカリプロテアーゼの生産量は、pUB110を保持する形質転換体に比べて約3倍高く、またpUB8Aを保持する形質転換体は、pUB8Yを保持する形質転換体に比べて約30倍の高いY<sub>a</sub>酵素の生産性を示した。

このうち0.2 μgと前述したpAY1由来の3.5Kb DNA断片0.05 μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物を、プロトプラス法を用いてバチルス・サチルス1012株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミドpUB8Aを保持する菌株を取得した。

#### Y<sub>a</sub>酵素の発現

pUB110、pUB8Y、pUB8Aを保持するバチルス・サチルス1012株の形質転換体を以下に組成を示す培地(溶性澱粉9.0g/1、ポリペプトン5(大正栄養社製)5.0g/1、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>5g/1、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/1、硫酸カナマイシン5.0mg/1、pH 7.5)を含む坂口フラスコに植菌し33℃にて90時間培養した。培養上清のアルカリプロテアーゼ活性はアンソニー萩原の変法(Hagiwara, B., J. Biochem. 45, 188 (1958))に準じて測定した。すなわち35℃、pH10.5の条件下で10分間反応し、1分間にチロシン1 μg相当

表 1

	APU/ml
Bacillus subtilis 1012 (pUB8Y)	850
(pUB8A)	25400
(pUB110)	320

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子の構造遺伝子領域の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第2図は、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子のうち構造遺伝子のN末端側及びプロモーター領域を保持するプラスミドpYT101の制限酵素切断地図である。

第3図は、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子のうち構造遺伝子C末端側及びターミネーター領域を保持するプラスミドpYB2の制限酵素切断地図である。

第4図は、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子のうち構造遺伝子中央部を保持するプラスミドpYX1の制限酵素切

堅持到底。

第5図は、バチルス・ライヘンホルミスLB8907より単離したアミラーゼ遺伝子を保持するプラスミドpTA1の制限酵素切断地図である。

第6図は、バチルス・ライヘンホルミスLB8807より單離したアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域近傍の塩基配列およびそれに對応するアミノ酸配列である。

第7図は、p YT 101とp YB 2のY a 酵素遺伝子の領域を連結したプラスミドp TB 3の作製行程図である。

第8図は、pTEB3のうちY<sub>a</sub>酵素遺伝子の領域をバチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Yの作製行程図である。

第9図は、pTB3EBのY<sub>a</sub>酵素遺伝子のプロモーター領域をpTA1Bのアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換し、バチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Aの作製行程図である。

B a : BamHI	B c : BclI
B g : BglII	C : ClaI
E : EcoRI	H : HinclI
K : KpnI	P : PstI
S : SphI	X b : XbaI
X m : XmaI	
AP : アルカリフォスファターゼ	
M C S : マルチクローニングサイト	
A p' : アンピシリン耐性遺伝子	
T c' : テトラサイクリン耐性遺伝子	
o r f : 機器領域。	

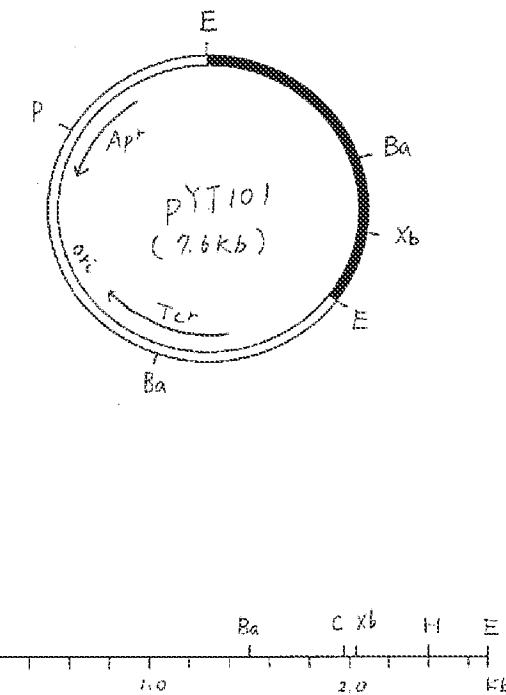
卷之三

卷之三

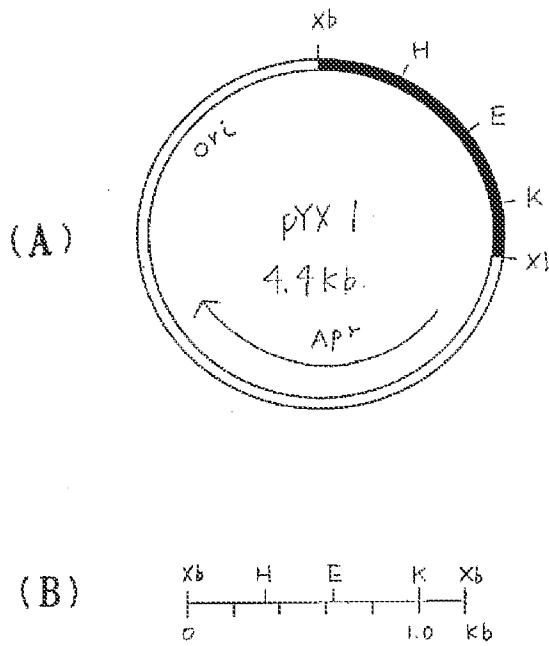
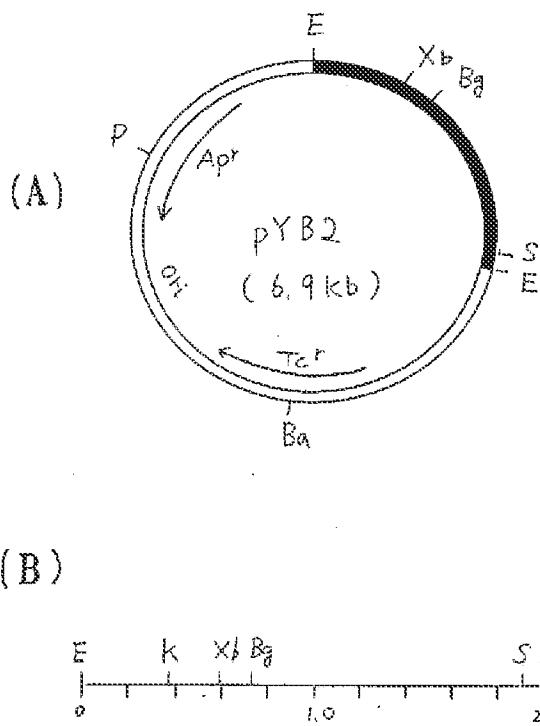
卷之三

卷之三

卷之三

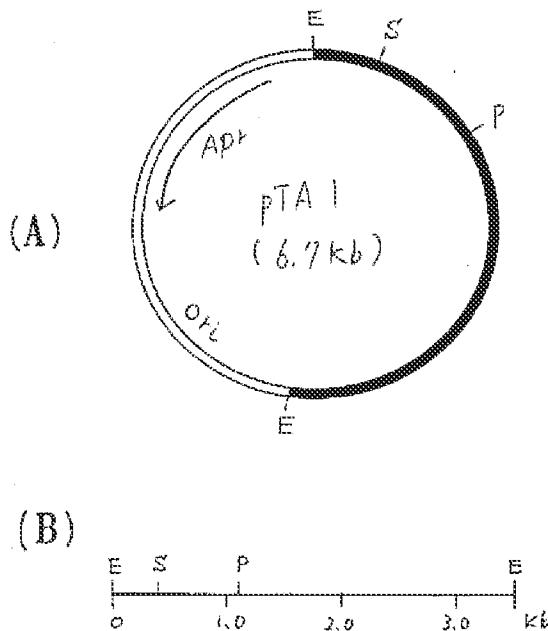


紙 2 面



卷 63

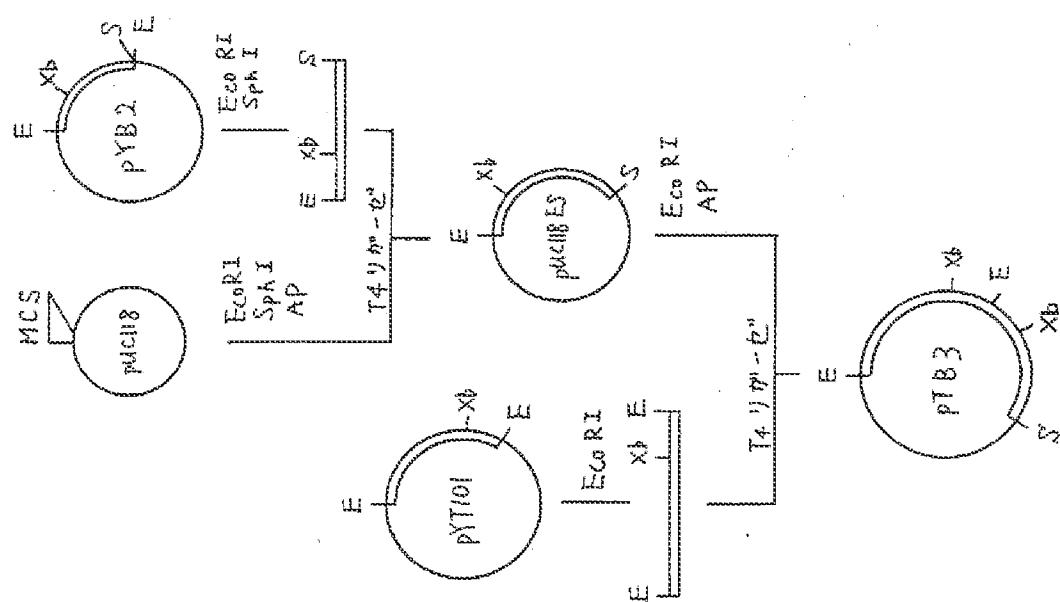
第 4 題



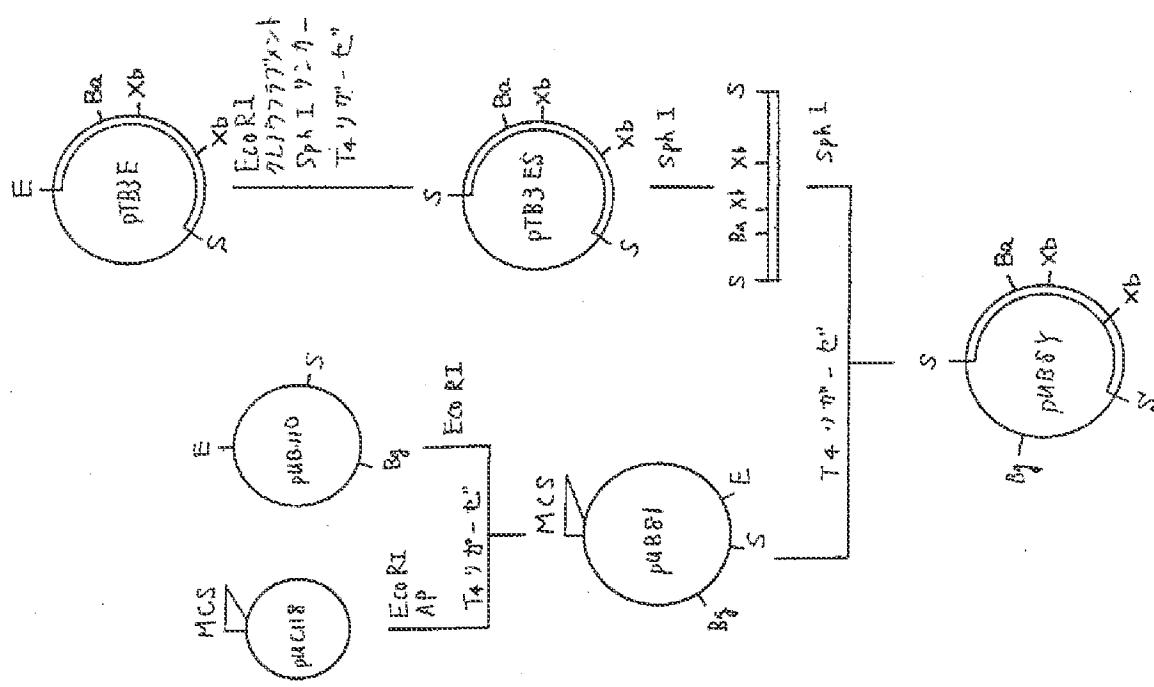
第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

CAACGTCCAGATGCTCTGAAGACATTATTAACGCTGAAACCAAAAGCTATCAATT  
 1 80  
 CGTAACTCTATCTAGCTGAACAAGTGAAGAACCAAGACAGACGCTATTCAATAATGACTA  
 81 120  
 GAAAGCCCATATCGCTTTCTTTGAAAGAAAATATAGGAAAATGCTATTCTTAA  
 121 180  
 1 2  
 MetLys  
 ATTCTGAATATTTATAACAATATCATATGTTCACATTCAAAGGGGAGGAGAACATGAAA  
 181 240  
 3 33  
 GlnGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu  
 CAACAAAAACGGCTTACGCCGATTGCTGCCCTGTTATTTGGCTCATCTCTGGCTC  
 241 300  
 34 37  
 ProAlaSerAla  
 CCTCATTCTGCA  
 301 312

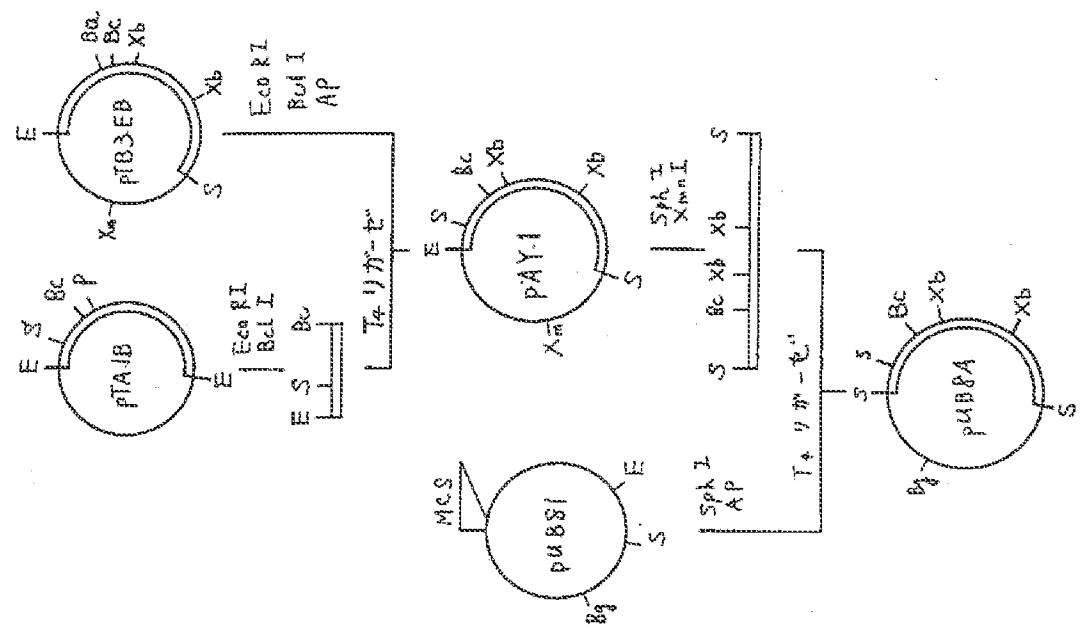
第 5 図



第 7 図



第 8 図



第 9 図

## 手 続 换 正 書 (方式)

平成 3 年 8 月 27 日

特許庁長官 横 松 敏 翔

1. 事件の表示 平成 2 年特許願第 327110 号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼ Y<sub>a</sub> 酶素をコードする DNA 及び該 DNA を用いたアルカリプロテアーゼ Y<sub>a</sub> の製造方法

3. 换正をする者

事件との関係 出願人

名 称 (876) ライオン株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号  
電話 (代) 3211-8741

氏 名 (5995) 井理士 中 村 稔

5. 换正命令の日付 平成 3 年 3 月 12 日

6. 换正の対象 図 面

7. 换正の内容

図面の第 1 図 (No. 2) (No. 3) 及び (No. 4) を別紙の通り補正する。

(1) 明細書の以下の箇所を以下の通り補正する。

頁	行	誤	正
6	下から 4	計算	生産
11	10	染色体菌	染色体
15	下から 2	Subtilis	subtilis
16	12	コーンスティーブリカーナ	コーンスティーブリカーナ
21	下から 4 ~ 3	プロネンシーグエンサー	プロティンシーグエンサー

(2) 図面の第 1 図 (No. 2) (No. 3) (No. 4)、

第 6 図及び第 9 図を別紙の通り補正する。

## 手 続 换 正 書 (方式)

平成 3 年 8 月 27 日

特許庁長官 横 松 敏 翔

1. 事件の表示 平成 2 年特許願第 327110 号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼ Y<sub>a</sub> 酶素をコードする DNA 及び該 DNA を用いたアルカリプロテアーゼ Y<sub>a</sub> の製造方法

3. 换正をする者

事件との関係 出願人

名 称 (876) ライオン株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号  
電話 (代) 3211-8741

氏 名 (5995) 井理士 中 村 稔

5. 换正命令の日付 自 発

6. 换正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄  
図 面

7. 换正の内容

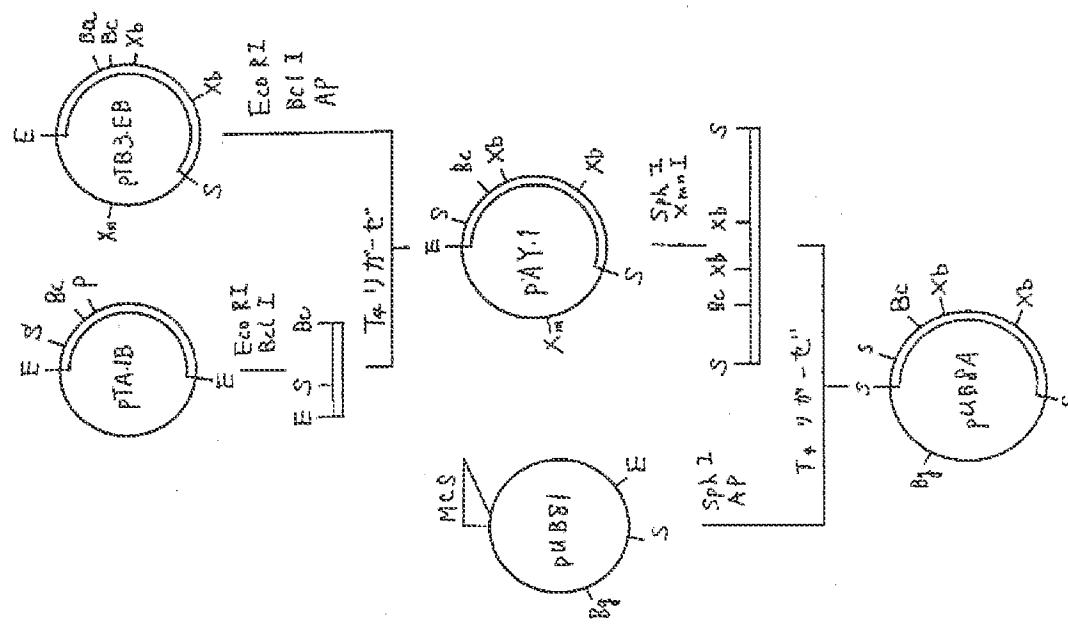
特許庁  
署名

## 第 1 図 ヤマモト電伝子 構造記録とアミノ酸配列(その2)

第十一回 金玉替夢還元子 終基說劍子 諸侯見

## 第1 図 Y染色体子座配列とアミノ酸配列(3/4)

588	609	620	631	642	653	664	675	686	697	708	719	730	741	752	763	774	785	796	807	818	829	840	851	862	873	884	895	906	917	928	939	950	961	972	983	994	1005
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------



第9回